



Hidrofil kölcsönhatási folyadékkromatográfia (HILIC) lipidomikai alkalmazása

Dr. Berkecz Róbert¹, Kovács Nóra¹, Prof. Thurzó László², Dr. Aljoša Mandić³, Dr. Szegedi Viktor⁴ és Prof. Janáky Tamás¹

¹⁾ Orvosi Vegytani Intézet, SZTE, 6720, Szeged, Dóm tér 8
²⁾ Onkoterápiás Klinika, SZTE, 6720, Szeged, Korányi Fásor 12
³⁾ Vajdasági Onkológiai Intézet, UNS, 21000, Újvidék, Szerbia, Hejduk Veljkova 3
⁴⁾ Szegedi Biológiai Kutatóközpont, 6726, Szeged, Temesvári körút 62

Bevezetés

A HILIC elválasztási módszer elterjedése a proteomika és a metabolomika mellett a lipidomika területénél is megfigyelhető. A glicerofosfolipidek (FL) fő sejtmembrán alkotók és jelvivő molekulák, az összetételükben bekövetkező változások kapcsolatba hozhatók számos idegrendszeri illetve rosszindulatú daganatos megbetegedésekkel, úgy mint Alzheimer-, Parkinson-kór, tüdőrák és méhnyak rák. A következőkben a HILIC kromatográfia két módszerét szeretnénk bemutatni agyi illetve plazma FL-ek minőségi és mennyiségi meghatározására, eltérő állófázisok és kromatográfiai körülmények alkalmazásával.

Idegrendszeri kutatás célja

Szorongásos reakciókban számos agyi régió rész vesz, úgy mint az amygda, a hippocampus, a cinguláris kéreg, a hypothalamus és különböző agytörzs területek. Molekuláris szinten megváltozott génexpressziót mutattak ki az agy különböző részein szorongásos állatmodelleknél. Korábbi kutatások skizofréria esetében az agyi foszfatidil-szerin (PS) és a foszfatidil-kolin (PC) FL osztályoknál bekövetkező mennyiségi megváltozásra hívták fel a figyelmet.

A munkánk célja volt 5 szorongó (AX) és 5 bátor (MX) egér prefrontális kérgének (PFC), dorsális (DHC) és ventrális hippocampusának (VHC) FL összetételének összehasonlítása.

Eredmények

Egér agy minták gyűjtése

Teljes egér agy kivétele után a PFC, DHC és VHC agyterületek kimetszése történt.

Agy homogenizálás

30 szoros mennyiségű 10 mM ammónium-acetátban történt (pH: 5,6) ultrahangos homogenizátorral (18A; 30 s-ként 10 s kezelés; 15 ciklus).

Módosított Folch extrakció

300 µL agy-homogenizátum + 10 µL belső standard (2,95 pmol/µL PC(14:0/14:0), 4,41 pmol/µL LPC(13:0), 3,15 pmol/µL PE(14:0, 14:0), 4,7 pmol/µL LPE(14:0), 2,90 pmol/µL PG(14:0/14:0), 4,18 pmol/µL PG(14:0), 2,85 pmol/µL PS(14:0/14:0), 3,25 pmol/µL PA(14:0, 14:0),) extrakciója két lépésben történt butil-hidroxi-tolul antioxidáns jelenlétében (0,02 mg/mL). Az extrakciót követően a bepárlást N₂ gázzal végeztük, majd a visszaoldást 500 µL 50/49/1 v/v/v % CHCl₃/IPA/H₂O-ban.

HILIC

FL osztályok HILIC elválasztása Agilent 1100 készülékkel történt **MERCK ZIC-HILIC 3×150 mm ikerionos** oszlopon; 5 µm részecskeméret; 200 Å pórusméret. A eluens: 97/3 H₂O/Aceton 5 mM ammónium-acetát (pH: 5,6); B eluens: 3/97 H₂O/Aceton 5 mM ammónium-acetát. Gradiens elúció: 98% B 0-5 perc; 98-88% B 5-75 perc; 98% B 76-90 perc. Oszlop hőmérséklet 40 °C; áramlási sebesség 200 µL/perc; 5 µL injektált térfogat

Petefészek rák biomarker kutatás célja

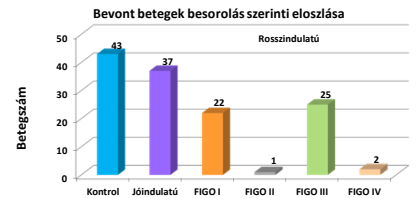
Roszzindulatú molekuláris változások, mint például metasztázis-szuppresszor génexpresszió, onkogén expresszió és malignus transzformáció kapcsolatba hozható a foszfatidil-kolin (PC) anyagcseréjében bekövetkező változásával.

A kutatás célja volt a petefészek rosszindulatú elváltozását jelző plazma foszfolipid biomarker azonosítása, amelynek során összesen 130 egészséges, jóindulatú és I, II, III és IV FIGO stádiumú beteg plazma mintájának FL profiljának összehasonlítása történt.

Eredmények

Vérvétel és a plazma gyűjtése

Vénás vér gyűjtése Vacutainer 6 mL EDTA K2 plazma csőbe. Centrifugálás 10 °C-on 900 g-vel 10 percig.



Módosított Folch extrakció

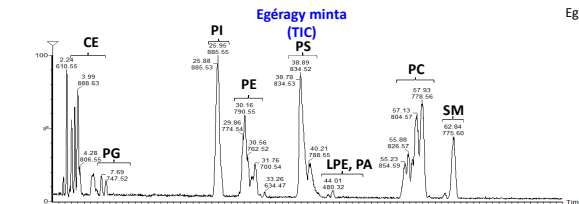
100 µL plazma + 20 µL belső standard (125 pmol/µL PC(14:0/14:0), 125 pmol/µL LPC(17:0), 50 pmol/µL PE(17:0, 17:0), 10 pmol/µL LPE(14:0), 5 pmol/µL PG(17:0/17:0), 5 pmol/µL PG(14:0), 50 pmol/µL PS(17:0/17:0), 50 pmol/µL PA(17:0/17:0), 50 pmol/µL LPA(17:0), 125 pmol/µL SM(18:1/12:0), 2 pmol/µL CE(18:1/12:0) extrakciója két lépésben történt butil-hidroxi-tolul antioxidáns jelenlétében (0,02 mg/mL). Az extrakciót követően a bepárlást N₂ gázzal végeztük, majd a visszaoldást 500 µL 80/20 v/v % CHCl₃/MeOH-ban.

HILIC

FL osztályok HILIC elválasztása Agilent 1100 HPLC készülékkel történt **Phenomenex Kinetex HILIC 2.1×150 mm** oszlopon; 2,6 µm részecskeméret; 100 Å pórusméret. A eluens: 50 mM ammónium-formiát (pH: 4,8); B eluens: acetón. Gradiens elúció: 94 – 70% B 0-15 perc; 70-94% B 15-16 perc; 94% B 16-30 perc. Oszlop hőmérséklet 50 °C; áramlási sebesség 400 µL/perc; 20 µL injektált térfogat.

ESI-MS^E

Waters Q-TOF Premier tömegspektrométer beállítással negatív módban: bemeneti kapilláris feszültség 3,0 kV; kúp feszültség: 26 V; tömegtartomány: 50–990 m/z; pásztázási sebesség: 1 s; porlasztó N₂ gáz hőmérséklete és áramlási sebessége: 250 °C, 500 liter/óra; forrás hőmérséklete: 95 °C, Ar ütközési gáz; ütközési energia MS és MS/MS esetében: 5 eV és 45 eV; tömegspektrometriás szoftver: MassLynxTM V4.1 SCN707.



Egér agy és humán plazma minták kromatogramjai

